Aus dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin
der Universität Würzburg.
Vorstand: Professor Dr. Walcher.

Über die Technik des Nachweises schwacher Agglutinine sowie der Faktoren M und N durch die Meniskusreaktion nach Ponsold

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde

vorgelegt von

Franz Henniges,

Zahnarzt, aus Saalfeld in Thüringen.

1937

Druckerei u. Verlag wissenschaftlicher Werke Konrad Triltsch, Würzburg

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg.

Referent: Professor Dr. K. Walcher.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Aus zivilrechtlichen, rassepolitischen und erbbiologischen Erwägungen verlangt der Staat von jedem Staatsbürger die Offenbarung seiner Abstammung. Diese Maßnahme stößt bei unehelicher Abstammung auf erhebliche Schwierigkeiten, da in vielen Fällen die Vaterschaft strittig ist, weil der Kindesmutter Mehrverkehr vorgeworfen wird. In der liberalistischen Epoche wurde in solchen Fällen durch Vereidigung der Kindesmutter eine Entscheidung herbeizuführen versucht. Nicht allzu selten folgten diesen Rechtsstreiten Meineidsverfahren. Erst die nationalsozialistische Regierung schuf hier die dringend nötige Wandlung. Der Blutgruppentypen-Feststellung wurde Beweiskraft eingeräumt. Auf dem Verordnungsweg wurden die Untersuchungsmethoden und die erforderlichen Eigenschaften für die zur Verwendung gelangenden Testsera festgelegt. Durch Untersuchung der Gruppen und der Faktoren M und N ist es möglich, jeden dritten Nichtvater auszuschließen.

Es war festgestellt worden, daß nicht nur die Serumeigenschaften nach dem Mendel'schen Vererbungsgesetz vererbt werden, sondern auch die Blutimmunfaktoren M und N, und zwar unabhängig von ersteren. Die Serumeigenschaften sind beim Säugling schwach entwickelt, so daß sie häufig in den ersten 12 Monaten nicht eindeutig dargestellt werden können.

Fr. Annen fand, daß sich die Serumeigenschaften bei Kindern von Eltern gleicher Gruppe schon in den ersten Lebenstagen in unverminderter Stärke nachweisen lassen. Die serologische Reife sei bei diesen Säuglingen 10 Tage nach der Geburt in vollem Umfang vorhanden.

Nach Schiff sollen eigene Serumeigenschaften der Säuglinge bei der Geburt nicht nachweisbar sein. Sie würden sich in den ersten Lebensmonaten bis spätestens innerhalb 2 Jahren deutlich entwickeln. Etwa nachgewiesene Serumeigenschaften seien nicht vom Säugling produziert, sondern materner Herkunft.

Anders ist es mit den Blutimmunfaktoren M und N, die an die Erythrozyten gebunden sind. Sie sind bereits beim Neugeborenen schon stark ausgeprägt und behalten ihre Stärke in der Entwicklung des Körpers bei. Sie sind beim gesunden Menschen bisher nur an die Erythrozyten gebunden nachgewiesen worden.

Es lassen sich also beim Säugling die Blutgruppen nicht mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nachweisen, dagegen

lassen sich die Faktoren M und N schon nach der Geburt mit Sicherheit bestimmen.

Die Verteilung der Faktoren M und N auf die Bevölkerung Deutschlands ist nach Erhebungen von Schiff, Lauer, Blaurock u. a. für M ungefähr 29,8%, für N ungefähr 20,4% und für MN ungefähr 49,8%.

Der Faktor M ist in MN-Verbindungen weit stärker als N, so daß N häufig bei der Untersuchung nicht deutlich in Erscheinung tritt; was natürlich nicht ausschließt, daß zuweilen der Faktor N stärker als M sein kann. Schwache M-Fälle sind allerdings in der Literatur bisher nur einzelne als Seltenheit bekannt.

Zur Darstellung der Blutimmunfaktoren M und N werden Testsera von Kaninchen benötigt. Diese Sera, sog. Rohsera, müssen durch elektive Absorption spezifisch für M und N gemacht werden. Die Industrie stellt mehr oder weniger hochwertige Sera her, die für die einzelnen Faktoren spezifisch sind, so daß den Untersuchern die außerordentlich mühsame und kostspielige Selbstherstellung erspart bleibt. Zur Serumgewinnung gehört große Erfahrung, da nicht jedes Kaninchen die gewünschten Antikörper bildet.

Die Darstellung der Agglunation bei den Blutimmunfaktoren ist im Prinzip der Blutgruppen-Untersuchung gleich, deshalb wurden die Methoden für die M- und N-Bestimmung der Klassischen Blutgruppenbestimmung entlehnt. Im Folgenden soll die von Ponsold angegebene Meniskus-Reaktion für den Nachweis schwacher Agglutinine auf ihre Brauchbarkeit für die Bestimmung der Blutimmunfaktoren M und N, besonders in MN-Fällen untersucht werden. Zum Vergleich wurden jeweils mit dem gleichen Blut und dem gleichen Serum nach der Kölner Methode, dem Hängenden Tropfen und die Absorption ohne Titerreduktionsbestimmung nach Ponsold durchgeführt. Vor jeder Untersuchung wurde die Titerhöhe des Serums auf einer Tüpfelplatte durch Tropfenverdünung mit Testblutkörperchen festgestellt. Zur Untersuchung wurde 4 Tage altes Blut und Frischblute verwendet. Es wurden 2% Natriumzitrat-Blutkörperchenaufschwemmungen hergestellt. Diese Blutkörperchenaufschwemmungen wurden 3 bis 4 mal durch Zentrifugieren mit Natriumzitrat gewaschen, wobei beim ersten Mal der Leukozyten-Niederschlag mit abpipettiert wurde. Es hatte sich herausgestellt, daß bei der Meniskus-Reaktion die Erythrozyten nach einmaligem Waschen nach Ablauf der Reaktionszeit ziemlich fest an der Capillarwand klebten und so die Beobachtung erheblich störten. Dann wurden Testserum-Verdünnungen von 1:1 bis 1:128 hergestellt. Mit diesen Testserum-Verdünnungen und den Blutkörperchenaufschwemmungen

wurden dann die Untersuchungen nach den 4 angegebenen Methoden durchgeführt.

Für die Meniskus-Reaktion wurden Capillaren von 10 cm Länge und 1/2 mm lichte Weite etwa 30 mm mit Testserum-Verdünnung angefüllt. Die Blutkörperchen-Verdünnung wurde auf Capillaren von gleichem Format gefüllt. Die Serumsäule wurde durch Senkrechtstellung an ein Ende geführt und mit der Blutkörperchenaufschwemmung in Berührung gebracht, so daß eine geringe Menge der Aufschwemmung in die Serumcapillare eindrang. Nach Zurückführen der Serumsäule von der Öffnung wurde diese über der Flamme zugeschmolzen. Die Capillare wurde dann durch ein Blatt Papier hindurchgesteckt und nach 1 bzw. 4 Stunden wurde die Reaktion im Dunkelfeldmikroskop beobachtet. Hierzu wurde das Mikroskop in waagrechte Lage gebracht, um das Absinken der Erythrozytengirlande bzw. der Agglutinationstrauben beobachten zu können. (Im mikroskopischen Bild ist es umgekehrt!).

Bei der Absorption ohne Titerreduktionsbestimmung wurde statt Erythrozytenaufschwemmung ein ziemlich dicker Brei verwendet. Da bei dieser Methode das Erkennen des Grenzzustandes zwischen erfolgter und ausbleibender Agglutination wichtig ist, ist diese Methode bei Testserum-Verdünnungen höher als 1:4 nicht mehr brauchbar, da bei dieser Verdünnung die Agglutination nicht mehr deutlich feststellbar ist.

Die Kölner Methode gleicht im Prinzip dem Hängenden Tropfen. Je 1 Tropfen Testserum bzw. Verdünnung und 1 Tropfen Erythrozytenaufschwemmung werden zusammengebracht und werden für eine Stunde unter eine Glasglocke mit nassem Zellstoff gebracht (feuchte Kammer). Es soll hierdurch eine Verdunstung des Tropfens verhindert werden.

Der Hängende Tropfen wurde nach der gebräuchlichen Methode ausgeführt.

Wassermann-Blut B *a* M 4 Tage nach der Entnahme.

Tests. Verd.	Men. R.	Absorpt.	Häng. Tro.	Kölner M.
1:1	+++	+++	+++	++
1:2	+++	++	++	+
1:4	++	+	+	+
1:8	+	—	—	—
1:16	+?	—	—	—
1:32	—	—	—	—
1:64	—	—	—	—

Zeichenerklärung:

+++ = restlose Agglutination.
Girlanden- und Traubenbildung.
++ = teilweise Agglutination.
Traubenbildung.
\+ = schwache Agglutionation.
Einzelne kleine Trauben bis Griesbildung.

Venülen-Blut A β M — 4 Tage nach der Entnahme.

Tests. Verd.	Men. R.	Tests. Bering anti M Absorpt.	Häng. Tro.	Kölner M.
1:1	+++	+++	+++	+++
1:2	+++	++	++	++
1:4	++	+	+	+
1:8	+	—	+	—
1:16	+?	—	—	—
1:32	—	—	—	—

Venülen-Blut B α M — 4 Tage nach Entnahme.

Tests. Verd.	Men. R.	Tests. Bering anti M Absorpt.	Häng. Tro.	Kölner M.
1:1	+++	+++	+++	+++
1:2	+++	++	++	+
1:4	++	+	+	+
1:8	+	—	—	—
1:16	+?	—	—	—
1:32	—	—	—	—

In den ersten 2 Stufen sind die Reaktionen bei allen 4 Methoden eindeutig und ohne Schwierigkeiten abzulesen. Bei höheren Testserum-Verdünnungsgraden wird die Ablesung sehr schwierig, da Pseudoagglutination und Geldrollenbildung von spezifischer Agglutination unterschieden werden müssen. Das ist besonders bei der Meniskus-Reaktion schwierig, da bei dieser der Ablauf der Reaktion anscheinend auch von physikalischen Momenten beeinflußt wird.

Bei der Meniskus-Reaktion treten bei Verdünnungen bis 1:2 noch sog. Agglutinationsgirlanden auf, die eindeutige spezifische Agglutination darstellen. Einzelne umherschwimmende Erythrozyten sind nicht zu sehen. Bei 1:8 muß man schon einzelne Trau-

ben aus umfangreichem „Schneegestöber" von Erythrozyten heraussuchen. Bei 1:16 lassen sich nur noch einzelne Verdichtungen erkennen, die man gerade noch als Reaktion bezeichnen kann. Allerdings ist keine Gewähr vorhanden, ob es sich um spezifische Reaktion handelt und nicht um Geldrollenbildung oder ähnliches.

Bei teilweiser Agglutination ist die Beobachtung beim Hängenden Tropfen sehr ungenau. Nur an den Randpartien kann man aneinanderliegende Erythrozyten beobachten. Ob diese nun durch Agglutination, Geldrollenbildung oder durch die Oberflächenspannung des Tropfens zusammengekommen sind, läßt sich kaum entscheiden. Die einfachste und sicherste, allerdings auch sehr grobe Methode ist die Tüpfelplatten-2-Tropfen-Methode. Durch Bewegung der Platte kann man Pseudoagglutination verhindern, ohne dabei die Beobachtung auszusetzen. Die Absorption ohne Titerreduktionsbestimmung zeigte bis zu einer Verdünnung von 1:4 positive Reaktion. Diese Methode hat den großen Vorteil der Nachkontrolle bei der Auswertung des Serums.

Um Vergleichsmöglichkeiten zu bekommen, wurden ferner Untersuchungen auf die Klassichen Blutgruppen nach der Meniskus-Reaktion durchgeführt. Gleichlaufend mit den Meniskus-Reaktionen wurden Tüpfelplatten-Kontrollen angefertigt.

1. Blutkörperchen A β N + Serum B α

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Meniskus R	+++	+++	++	+	+?	—′	—
Platte	+++	++	++	+	—	—	—

2. Blutkörperchen AB MN + Serum Ø α β.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Meniskus R.	+++	++	++	+	—	—	—
Platte	+++	+++	+++!	+	—	—	—

3. Blutkörperchen B α MN + Serum A.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Meniskus	+++	+++	++	+	—	—	—
Platte	+++	++	++	+	—	—	—

4. Blutkörperchen B α MN + Haemotest anti B.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Meniskus	+++	+++	++	++	—	—	—
Platte	+++	++	++	—	—	—	—

5. Blutkörperchen A B MN + Haemotest anti A.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Meniskus	+++	+++	+++	+	—	—	—
Platte	+++	++	++	—	—	—	—

6. Blutkörperchen A B MN + Haemotest anti B.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Meniskus	+++	+++	++	+	—	—	—
Platte	+++	++	++	+	—	—	—

Diese Untersuchungen, die allerdings mit serologisch reifen Bluten gemacht wurden, zeigen, daß die Meniskus-Reaktion gegenüber der gebräuchlichen Tüpfelplatten-Methode in der Diagnose keine auffallenden Vorteile bietet. In zwei Fällen (4 und 5) zeigte die Meniskus-Reaktion auf höherer Verdünnungsstufe noch positive Reaktion als die Tüpfelplatte.

Bei der Faktorenbestimmung ist die Meniskus-Reaktion den übrigen drei Methoden überlegen, allerdings unter Verzicht auf unbedingte Sicherheit.

Bei der Untersuchung von MN-Fällen traten plötzlich Schwierigkeiten auf, welche ganz kraß zeigten, daß man bei forensischen Fällen immer mehrere und verschiedenartige Methoden in Anwendung bringen soll. Beim Fall Vater W. (A β MN) hörte bei der Untersuchung auf M bei einer Serumverdünnung von 1:4 jegliche Reaktion auf, so daß vermutet wurde, daß es sich hier nicht um spezifische Reaktion, sondern um Pseudoagglutination oder Geldrollenbildung handele. Das mikroskopische Bild gab hierüber keinen eindeutigen Aufschluß, zumal es sich bei 1:1 nicht um restlose Agglutination handelte.

Fall Vater W. A β MN.

Meniskus-Reaktionen.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
anti M	++	++	Ø	—	—	—	—
anti N	+++	+++	++	+	—	—	—

Platten-Probe: anti M 1:2 = ++
anti N 1:16! = +

Kontroll-Untersuchungen:

	Cap. M.	Obj. Tr.	Schiff
Bering anti M	++	+++	+++
Bering anti N	+++	+++	+++

Große Absorption M = +

Es handelt sich also tatsächlich um spezifische Reaktion. Demnach könnte es sich um ein schwaches M handeln.

Um nun ganz sicher zu gehen, wurden für die folgenden Untersuchungen jeweils mehrere Beweisproben unternommen.

Fall S. A β MN.

Meniskus-Reaktionen.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Ber. anti M	+++	++	+	—	—	—	—
Ber. anti N	+++	+++	+	+	—	—	—

Tüpfelplatten-Kontrolle.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
anti M	+++	++	+	—	—	—	—
anti N	+++	++	++	++	+!	—	—

	Cap.	Objekttr.	Schiff
anti M	+++	+++	+++
anti N	+++	+++	+++

Große Absorption M +

Fall K. Ø α β MN.

Meniskus-Reaktion.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
anti M	+++	+++	+++	++	—	—	—
anti N	+++	+++	++	++	+	—	—

	Cap.	Objekttr.	Schiff
anti M	+++	+++	+++
anti N	+++	++	+++

Fall F. Aβ MN.

Meniskus-Reakionen.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
anti M	+++	++	+	—	—	—	—
anti N	++	++	+	—	—	—	—

	Cap. M.	Objekttr.	Schiff
anti M	+++	+++	+++
anti N	+++	++	++

Große Absorption N +

Fall Z. Aβ M? N.

Meniskus-Reaktionen.

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
anti M	++	+	—	—	—	—	—
anti N	+++	++	+	+	—	—	—

	Cap.	Objekttr.	Schiff
anti M	+?	—	—
anti N	+++	+++	+++

Große Absorption:

1. Serum anti M Titer 32 = M —
2. Serum anti M Titer 8 = M + !!
3. Serum anti M Titer 16 = M —
4. Serum anti M Titer 32 = M —

Meniskus-Reaktionen.
Blutkörperchen Z + Bering anti M 1630, 1631, 1632.

	1:1	1:2	1:8	1:4	1:16	1:32
Bering anti M 1630	++	++	—	—	—	—
Bering anti M 1631	++	+	—	—	—	—
Bering anti M 1632	++	++	—	—	—	—

Spezifitäts-Probe auf Tüpfelplatte:

Körp. Z.	+ anti M 1630	+ anti M 1631	+ anti M 1632
	—	—	—

Testblk. M	+ anti M 1630 +++	+ anti M 1631 ++	+ anti M 1632 ++
Testblk. N	+ anti M 1630 —	+ anti M 1631 —	+ anti M 1632 —

Man kann also mit Sicherheit sagen, daß Z nicht den Faktor M hat, obwohl die Capillare, die 2. Absorption und die Meniskus-Reaktion positiv waren.

Um dieses Ergebnis im Bild festhalten zu können wurden die Meniskus-Reaktionen in Capillaren von 1 mm lichter Weite mit dem gleichen Material wiederholt. Das Ergebnis war das gleiche wie in den 1/2 mm Capillaren. Das Photographieren machte insofern große Schwierigkeiten, als die Capillarwand durch die Krümmung unverhältnismäßig dick erschien und nur wenig freien Raum mit der Reaktion unüberdeckt ließ. Ebenso war die Belichtung schwierig, da doch eine Bewegungsphase im Bild festgehalten werden soll.

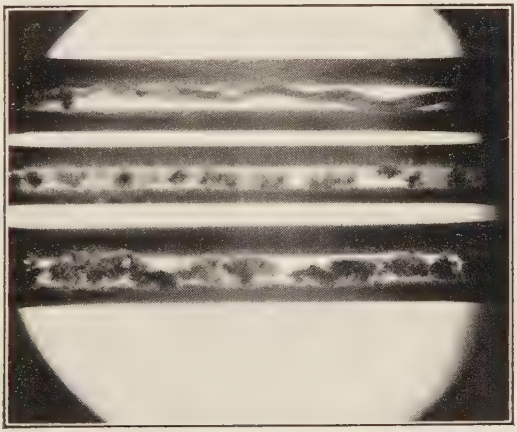

Bild 1. Positive Meniskus-Reaktion.
Körperchen Z + Serum Bering anti N 1:1, 1:2, 1:4.

In der obersten Capillare typische Girlandenbildung, die jedoch nur bei genügender Menge von Blutkörperchen zur Ausbildung gelangt. Zu wenig Blutkörperchen bilden Trauben wie in Capillare 2+3 bei verdünntem Serum.

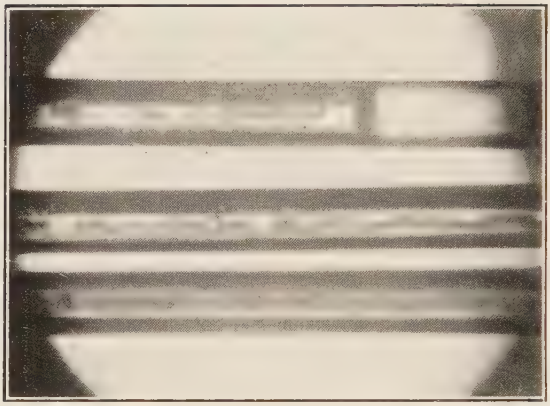

Bild 2. Fall Z.
Fragliche positive Meniskus-Reaktion.
Körperchen Z + Serum Bering anti M 1:1, 1:2, 1:4.

In der obersten Capillare Teilgirlande und Traubenbildung.
In der mittleren Capillare schwach angedeutete Girlande.
In der untersten Capillare „Schneegestöber".

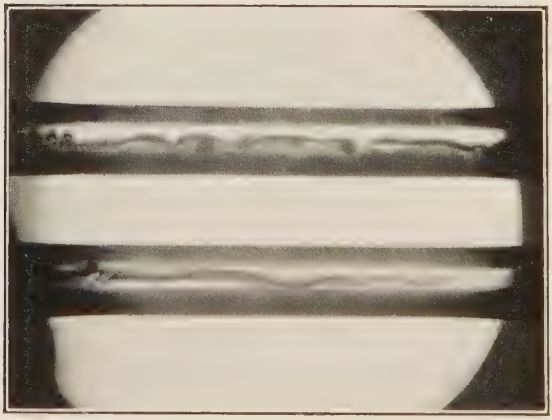

Bild 3. Vergleich zu Bild 1 + 2.

Fall W. A β M N.

Die obere Capillare enthält Blutkörperchen W und Serum Bering anti N 1:1 und zeigt positive Reaktion. Die von dicken kompakten Trauben durchsetzte Girlande ist in der Ablösungsphase von der Wand. Deshalb erscheint der noch an der Wand anhaftende Teil der Girlande als dunkle Erythrozytenwolke. Die untere Capillare enthält Körper-W und Serum Bering anti M 1:1 und zeigt positive Reaktion. Die Girlande ist im Absinken begriffen.

Die Ursache für das Versagen der Meniskus-Reaktion beim Fall Z. konnte nicht sicher geklärt werden. Zwei Erklärungsmöglichkeiten wären, daß erstens bei der Serumherstellung nicht genügend oder mit einem weniger geeigneten Antikörper absorbiert wurde, und daß durch besonders starke Serumausnützung in der Capillare dies leichter offenbar wurde als bei anderen Methoden, daß zweitens diese Scheinreaktion durch physikalische Momente ausgelöst wurde.

Pietrusky's Auffassung, daß jede Blutfaktorenbestimmung M und N ohne Absorptionsuntersuchung keine Gewähr für eine richtige Diagnose gäbe, trifft besonders für die Meniskus-Reaktion zu. Die Meniskus-Reaktion ist für die Faktorenbestimmung M und N nicht ungeeignet, jedoch sind ihre Ergebnisse ohne gleichzeitige Kontrolluntersuchungen durch andere Methoden nicht in jedem Fall so deutlich, um ihr allein forensische Beweiskraft einzuräumen. Geldrollenbildung und Pseudoagglutination lassen sich nur schwer durch stärkere Vergrößerung oder gar Ölimmersion unterscheiden. Die sicherste Entscheidung läßt sich nur durch Absorption herbeiführen. Dadurch wird der Vorteil des geringen Materialverbrauchs bei der Meniskus-Reaktion nicht berührt, da von einer ganz geringen Blutmenge eine beträchtliche Menge 1% Erythrozyten-Aufschwemmung hergestellt werden kann und so immer noch genug Material für die Absorption übrig bleibt.

Diese merkwürdigen Erscheinungen beim Fall Z. sind im Laufe der Untersuchungen nur dieses eine Mal aufgetreten. In allen Fällen (außer Z.) konnte nachgewiesen werden, daß die Bildung einer kompakten Girlande oder Traubenbildung ohne umherschwimmende einzelne Erythrozyten spezifische positive Reaktion darstellen.

Unbedingte Sicherheit und Zuverlässigkeit bietet eine einzige Methode für alle Untersuchungsfälle niemals.

Die Meniskus-Reaktion ist unter dieser Einschränkung als geeignet, sowohl für die Bestimmung der Blutgruppentypen als auch für die Bestimmung der Faktoren M und N zu bezeichnen.

Literaturverzeichnis.

1. Steffan: Handbuch der Blutgruppenkunde.
2. Schiff: Die Technik der Blutgruppenuntersuchung für Kliniker und Gerichtsärzte. 3. Auflage.
3. Ponsold: Nachweis von Agglutininen schwächster Wirksamkeit. Meniskus-Reaktionen. Zeitschr. für ges. gerichtl. Medizin B 26.
4. Ponsold: Ein Absorptionsverfahren ohne Titerreduktionsbestimmung zum Nachweis der Blutimmunfaktoren M und N. Zeitschr. für ges. gerichtl. Medizin B 24.
5. Elbel: Zur Technik der Untersuchung auf die Bluteigenschaften M und N. Zeitschr. für ges. gerichtl. Medizin B 24.
6. Blaurock: Über die agglutinablen Eigenschaften M und N der Erythrozyten. Mü. med. Wo. 1932.
7. Holzer: Zum Nachweis der Bluteigenschaften M und N. Zeitschr. für ges. gerichtl. Medizin B 26.
8. Crome: Unsere Untersuchungen der Blutgruppen-Eigenschaften M und N. Zeitschr. für ges. gerichtl. Medizin B 20.

Lebenslauf.

Am 8. August 1912 wurde ich, Franz Henniges, als Sohn der Eheleute Matthias Henniges und Martha, geb. Rebatschek, in Saalfeld (Thüringen) geboren. Nach 4jährigem Besuch der Grundschule kam ich Ostern 1923 in die Sexta des Realgymnasiums zu Saalfeld. Ab Ostern 1930 besuchte ich die Deutsche Aufbauschule zu Rudolstadt (Thür.), wo ich am 15. Februar 1933 die Reifeprüfung ablegte.

Meine Studienzeit verbrachte ich in Würzburg, wo ich am 25. Oktober 1934 die zahnärztliche Vorprüfung ablegte. Im Sommer 1935 genügte ich meiner halbjährigen Arbeitsdienstpflicht in Coburg.

Am 10. Mai 1937 erhielt ich meine Approbation als Zahnarzt.

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich nicht versäumen, dem Vorstand des Institutes für gerichtliche und soziale Medizin, Herrn Prof. Dr. K. Walcher, für die Überlassung des Themas und für die zuteilgewordene Unterstützung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.